



Centro Universitário de Brasília – UniCEUB

Faculdade de Ciências da Educação e Saúde – FACES

Biologia

**AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE AGUDA DE
PRODUTOS COMERCIAIS À BASE DE *Bacillus*
thuringiensis E *Bacillus sphaericus* E DA
ELIMINAÇÃO DE ESPOROS EM PEIXES DA
ESPÉCIE *Hyphessobrycon eques*.**

BÁRBARA CRISTINA GOMES DE MIRANDA

Brasília-2008

Centro Universitário de Brasília – UniCEUB
Faculdade de Ciências da Educação e Saúde – FACES
Bacharelado em Ciências Biológicas
Professora: Marina R. Frizzas

**AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE AGUDA DE
PRODUTOS COMERCIAIS À BASE DE *Bacillus*
thuringiensis E *Bacillus sphaericus* E DA ELIMINAÇÃO
DE ESPOROS EM PEIXES DA ESPÉCIE
Hyphessobrycon eques.**

BÁRBARA CRISTINA GOMES DE MIRANDA

Monografia apresentada como requisito para
a conclusão do curso de Biologia do Centro
Universitário de Brasília

Orientador: Dr. Eduardo Cyrino Oliveira
Filho (UniCEUB/Embrapa Cerrados).

Brasília- 2º / 2008

DEDICATÓRIA

Aos meus pais, Mário e Valdecy, meus irmãos Felipe, Michael e Carol e ao meu namorado Marcelo. Ao meu orientador professor Dr. Eduardo Cyrino Oliveira Filho.

AGRADECIMENTOS

Ao professor Dr. Eduardo Cyrino Oliveira Filho, pela orientação do trabalho, e principalmente pela amizade, ensinamentos e dedicação no decorrer de todo o trabalho.

À professora Dra. Marina Frizzas, pela amizade e auxílio no decorrer do trabalho.

Ao Ms. Felipe Ramos, pelas contribuições ao trabalho no fornecimento dos produtos, realização parcial da metodologia, ensinamentos e dedicação.

À equipe do LABOCIEN, principalmente aos amigos Edson e Josefa, pela receptividade amigável e disponibilidade ao longo da pesquisa.

Aos professores do Curso de Ciências Biológicas do Centro Universitário de Brasília, por todos os ensinamentos e por toda a confiança e investimento durante os cinco anos de curso.

Às alunas do estágio de toxicologia do curso de Biomedicina pela participação nos ensaios.

Aos colegas de sala, Rafael e Mariana, pela amizade e incentivos.

Ao Dr. Daisaku Ikeda, pelas cartas de incentivos e por me ensinar o Budismo de Nitiren Daishonin.

À minha família, que acredita no meu potencial e todos dias me ensina o valor da vida.

Aos amigos e namorado, pela grande amizade, pelas maravilhosas conversas e pelos momentos de descontração, que com certeza me auxiliaram no decorrer do trabalho.

A todos, que direta ou indiretamente contribuíram de alguma forma para a realização deste trabalho.

Muito obrigada!

RESUMO

Bactérias naturalmente patogênicas para os insetos têm sido utilizadas para reduzir o uso de agrotóxicos e agir no controle biológico de insetos pragas de culturas agrícolas, bem como de vetores de doenças. Uma das exigências para registro desses produtos, publicada pela Instrução Normativa nº 03/06 a ANVISA, IBAMA e MAPA, é a realização dos testes de ecotoxicidade, que determinam os potenciais danos a organismos não-alvo do bioinseticida. Neste contexto, o objetivo do presente trabalho foi avaliar a toxicidade aguda de dois produtos sobre peixes da espécie *Hyphessobrycon eques* e determinar a quantidade de esporos remanescente no corpo dos peixes após o término da exposição. Para a realização dos ensaios seguiu-se o protocolo experimental da Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos (USEPA), que recomenda a exposição dos organismos a uma concentração máxima do agente. A cepa utilizada no produto à base de *Bacillus sphaericus* foi a S242, e do *Bacillus thuringiensis* foi a S1806. Foram testadas as concentrações dos produtos contendo as bactérias na ordem de 10^6 , 10^5 , 10^4 , 10^3 e 10^2 esporos por mililitro de água de diluição. Os peixes foram expostos aos produtos à base de *B. thuringiensis* e *B. sphaericus* por meio do agente dissolvido na água. Durante 30 dias 3 peixes foram expostos em duplicata às concentrações específicas de cada produto do agente dissolvido e 3 peixes em duplicata para o controle negativo contendo água mole sintética. Às renovações de solução ocorreram duas vezes a cada semana. Ao final de 30 dias, os organismos expostos e que sobreviveram foram colocados em água limpa onde permaneceram por cinco dias, sendo coletados periodicamente para a quantificação do número de esporos presentes no corpo de cada indivíduo. Após o término da exposição, foi observada diferença entre a toxicidade dos produtos em termos de esporos por mililitro, contudo em termos do porcentual de diluição da formulação os resultados foram muito semelhantes, evidenciando que, os efeitos adversos causados nos peixes foram devido à toxicidade da formulação e não das bactérias. A redução do número de esporos foi significativa no corpo dos peixes após 96 horas de exposição em água limpa, mostrando que tais produtos não são persistentes nos organismos.

Palavras-chave: controle biológico, espécie não-alvo e bioinseticidas.

SUMÁRIO

1.INTRODUÇÃO.....	1
1.1. Controle biológico.....	1
1.2.Principais <i>Bacillus</i> utilizados na saúde pública e agricultura.....	2
1.3.Caracterização das bactérias <i>B. sphaericus</i> e <i>B. thuringiensis</i>	3
1.4.Principais toxinas produzidas por <i>B. thuringiensis</i> e <i>B. sphaericus</i>	5
1.5. Regulação de bioinseticidas no Brasil.....	5
1.6. Efeitos dos <i>Bacillus</i> sobre organismo não-alvo.....	8
2. MATERIAL E MÉTODOS.....	10
2.1. Local dos ensaios	10
2.2. Descrição dos produtos à base de <i>B. thuringiensis</i> e <i>B. sphaericus</i>	10
2.3. Caracterização do H. Eques (mato grosso).....	10
2.4. Água mole sintética.....	12
2.5. Determinação da toxicidade aguda dos produtos.....	12
2.6. Ensaio de identificação da presença de microrganismos no corpo dos peixes.....	13
2.7. Análise estatística.....	14
3. RESULTADOS.....	15
4. DISCUSSÃO	17
5.CONCLUSÃO	20
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	23

1. INTRODUÇÃO

1.1. Controle biológico

O controle biológico é a utilização intencional de organismos para combater uma população animal ou vegetal prejudicial ao homem (Samways,1989). O emprego de inimigos naturais nas populações de pragas propiciou o surgimento do controle biológico aplicado, como uma biotecnologia baseada na utilização de recursos genéticos microbianos, insetos predadores e parasitóides, assim como os semioquímicos, substâncias utilizadas na comunicação intra e inter-específica (planta-inseto, inseto-inseto) (Aguiar-Menezes, 2003).

Após a Conferência das Nações Unidas para o Meio Ambiente e Desenvolvimento (ECO-92), vêm crescendo a conscientização da sociedade quanto aos problemas de conservação da qualidade do meio ambiente provocados por amplas atividades humanas, incluindo as relacionadas à exploração agropecuária. Isso provocou a busca pelo setor agropecuário de tecnologias para a implantação de sistemas de produção de enfoque ecológico, rentáveis e socialmente justos. Como resposta a essa demanda, a pesquisa científica tem avançado no desenvolvimento de soluções tecnológicas para uma agricultura sustentável (Menezes, 2001).

O controle biológico, muitas vezes, é utilizado em associação a outros métodos compatíveis de controle, como a aplicação racional de inseticidas não persistentes, análogos de feromônios e plantas resistentes ao ataque de insetos praga (Samways,1989). A tendência é aumentar no âmbito global às demandas pela utilização de práticas agrícolas menos agressivas ao meio ambiente, uma vez que o controle biológico tem as seguintes vantagens: protege a biodiversidade, maior especificidade e, portanto, com menor risco de atingir organismos não-alvos, não deixa resíduos tóxicos em alimentos, água e solo e aumenta o lucro do produtor, uma vez que tende a ser mais barato que os agrotóxicos (Menezes, 2001).

1.2. Principais *Bacillus* utilizados na saúde pública e agricultura

Bactérias naturalmente patogênicas para os insetos têm sido utilizadas para reduzir o uso de agrotóxicos e agir no controle de insetos vetores de doenças. Para combater insetos vetores de organismos patogênicos na saúde e agricultura, o mercado mundial de inseticidas chega a gastar de 6 a 8 bilhões de dólares anuais. Sendo que os biopesticidas mal chegam a 2,5% desse total. A partir de 1980, a Organização Mundial da Saúde (OMS) conjugado a outros setores internacionais e laboratórios de pesquisa, estão desenvolvendo programas para a utilização de bactérias entomopatogênicas contra os insetos veiculadores de organismos nocivos. E outro importante avanço é o desenvolvimento da biologia molecular a partir da década de 1980 que permitiu melhorar geneticamente o desempenho destas bactérias (Petry *et al.*, 2004).

No Brasil, algumas espécies de insetos da Ordem Diptera, pertencentes às famílias Culicidae e Simuliidae são fundamentais na transmissão de patógenos de doenças humanas. No mundo, a cada ano, cerca de um bilhão de pessoas são acometidas por doenças causadas por organismos patogênicos veiculados por insetos vetores. Os culicídeos, conhecidos como mosquitos, pernilongos ou muriçocas são vetores de doenças, como a febre amarela, a dengue, malária, leishmaniose e as filariose, além de encefalites virais. Os gêneros mais importantes para o Brasil são *Aedes*, *Anopheles* e *Culex*. A fase imatura desses insetos é praticamente de hábito aquático, desenvolvendo-se sempre em águas paradas naturais ou antropizadas, límpidas ou poluídas (Soares, 2006).

O controle desses vetores de doenças está sendo utilizado no mundo todo devido ao interesse em saúde pública e para prevenir perdas econômicas em agropecuária, tanto em áreas rurais como em regiões metropolitanas. Impactos econômicos negativos e reações alérgicas por picadas de borrachudos ocorrem também em áreas turísticas e rurais que agravam o bem-estar da população. No Brasil, são poucos os trabalhos relacionados ao controle com *Bacillus thuringiensis*. O Rio Grande do Sul foi o primeiro estado a trabalhar com biolarvicida e outros estados já contam com alguns trabalhos (Petry *et al.*, 2004).

Dentre as bactérias usadas no controle biológico, *B. thuringiensis* é

responsável por até 95% do mercado de bioinseticidas (Praça *et al.*,2004). Atualmente, existem muitas formulações baseadas em *B. thuringiensis* dos sorotipos *B. thuringiensis aizawai*, *B. thuringiensis israelensis*, *B. thuringiensis kurstaki* e *B. thuringiensis brasiliensis* (Rabinovitch *et al.*,2000).

As primeiras estirpes entomopatogênicas descritas de *Bacillus sphaericus* foram isoladas na Califórnia a partir de larvas de *Culiseta incidens* (Diptera: Culicidae). Atualmente diversas estirpes tóxicas são conhecidas e são utilizadas para o controle de quase todas as espécies de mosquitos do gênero *Culex*, transmissores de filarioses, assim como o gênero *Anopheles* (Diptera: Culicidae), transmissores da malária. Por ser inofensiva ao homem, animal e ao meio ambiente ele é recomendado pela Organização Mundial da Saúde (OMS) em programas de saúde pública (Silva *et al.*,2002).

Essa bactéria é eficaz quando aplicada em águas poluídas, sendo assim, uma ótima opção para o combate ao mosquito urbano *Culex quinquefasciatus*, que vive em águas poluídas nas cidades tropicais e subtropicais e é um importante vetor da filariose bancroftiana (Regis *et al.*,1996).

O uso de biolarvicidas, em relação aos demais inseticidas químicos, possui as seguintes vantagens: não persistem no ambiente por muito tempo após a sua aplicação, são produtos seletivos, não fitotóxicos e suas formulações geralmente têm boa resistência às condições adversas (Petry *et al.*,2004).

1.3. Caracterização das bactérias *B. sphaericus* e *B. thuringiensis*

São bactérias Gram-positivas em forma de bastonete pertencentes à família Bacillaceae. No decorrer do seu ciclo de vida apresentam, principalmente, uma fase de crescimento vegetativo na qual a bactéria se multiplica por bipartição e a fase de esporulação que consiste na diferenciação da bactéria em esporo (Monnerat & Praça, 2006).

B. thuringiensis foi pela primeira vez descrita por Berliner em 1911 quando este pesquisador isolou o bacilo de *Anagasta kuehniella*. Posteriormente, ele o nomeou *B. thuringiensis* em homenagem a província de Thuringia (Alemanha), onde o primeiro inseto infectado foi encontrado (Polanczyk & Alves,

2003).

A ação entomopatogênica desta bactéria é devido à produção de cristais protéicos durante o processo de esporulação. Esses cristais são formados por polipeptídios conhecidos como proteínas Cry que apresentam ação específica aos insetos das ordens Lepidoptera, Diptera e Coleoptera (Capalbo *et al.*, 2005), além de dípteros vetores de doenças humanas como os mosquitos do gênero *Culex*, *Aedes* e *Simulium* (Berlitz & Fiuza, 2005).

B. sphaericus é uma bactéria conhecida de longa data como produtora de endotoxinas, recentemente descoberta como importante para controle biológico de culicídeos em sua fase larval. Estão descritas numerosas cepas deste agente bacteriano, sendo a formulação com a cepa 2362 considerada a mais eficiente para programas de controle de mosquitos, dado à alta toxicidade e custo de obtenção baixo (Germani *et al.*, 1987).

A toxicidade do *B. sphaericus* é devido à presença de cristais protéicos produzidos durante o processo de esporulação. Esses cristais são formados por uma toxina binária composta por duas proteínas que apresentam ação específica aos insetos vetores de doenças humanas (Silva *et al.*, 2002).

Os cristais desses *Bacillus*, ao serem ingeridos pelas larvas dos insetos-alvo, sofrem ação do pH intestinal e de proteases, que solubilizam o cristal e ativam as toxinas. Estas, por sua vez, se ligam a receptores situados no tecido epitelial do intestino da larva levando a quebra do equilíbrio osmótico da célula, que se incha e rompe, extravasando o conteúdo intestinal para hemocèle do inseto. Em consequência, a larva para de se alimentar, entra em paralisia geral e morre por inanição ou intoxicação (Fiuza, 2004).

Essas bactérias ocorrem em diversos ambientes e é facilmente isolada por métodos simples e eficientes. Já foi isolada de todas as partes do mundo, de diversos ecossistemas e substratos como o solo, água, folhas e insetos mortos. No entanto, a sua distribuição e suas relações ecológicas permanecem em discussão (Monnerat & Praça, 2006).

1.4. Principais toxinas produzidas por *B. thuringiensis* e *B. sphaericus*

Várias estirpes de *B. thuringiensis* produzem endotoxinas citolíticas denominadas de proteínas Cry, que é um dos formadores do cristal protéico. Estudos realizados sobre a esporulação mostraram que o cristal é formado do segundo estágio da esporulação e é liberado quando as células são lisadas. A classificação das proteínas Cry baseia-se na similaridade das seqüências de aminoácidos. Existem mais de 300 diferentes genes Cry e estão agrupadas em 49 classes (Monerat & Praça, 2006). Segundo as autoras, as etapas da esporulação e biogênese do cristal possuem sete estágios. No primeiro, a célula para seu crescimento e sua parede celular se modifica; no segundo, o septo de esporulação é formado, e a cromatina é dividida em duas partes, nesse momento aparece uma estrutura condensada que é o cristal; no terceiro, forma-se o pré-esporo; no quarto, ocorre o crescimento do esporo e a formação do cristal; no quinto, forma-se o envelope esporal em torno do esporo, e o cristal fora desse envelope continuam seu crescimento; no sexto, o esporo amadurece e o cristal atinge seu tamanho máximo; no sétimo, a célula se rompe e libera o cristal e o esporo.

Algumas cepas de *B. sphaericus* possuem ação semelhante ao *B. thuringiensis*, também sintetizam estruturas de cristais, mas de tamanhos diferentes, no qual o maior componente deste cristal é uma toxina binária composta por duas proteínas distintas de 51,4 e 41,9 kDa, denominadas respectivamente de P51 e P42. Essa bactéria ainda produz três toxinas adicionais denominadas de Mtx, Mtx2 e Mtx3. Essas são sintetizadas durante a fase de crescimento vegetativo e não se acumulam como cristais (Porter, 1996). As cepas que sintetizam a toxina binária são muito tóxicas, mostrando um espectro de ação altamente específico contra larvas de mosquitos, sendo os mais suscetíveis os pertencentes aos gêneros *Culex* e *Anopheles* (Rabinovitch *et al.*, 2000).

1.5. Regulação de bioinseticidas no Brasil

Os produtos biológicos utilizados no controle de pragas agrícolas são regulados pela Lei nº 7.802, de 11 de julho de 1989, que define agrotóxicos e

afins como “os produtos e os agentes de processos físicos, químicos ou biológicos, destinados ao uso nos setores de produção, no armazenamento e beneficiamento de produtos agrícolas, nas pastagens, na proteção de florestas, nativas ou implantadas, e de outros ecossistemas e também de ambientes urbanos, hídricos e industriais, cuja finalidade seja alterar a composição da flora ou da fauna, a fim de preservá-las da ação danosa de seres vivos considerados nocivos” (Brasil, 1989).

No Brasil o Ministério da Agricultura, Pecuária e do Abastecimento (MAPA), a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) e o Instituto Brasileiro de Meio Ambiente e dos Recursos Nacionais Renováveis (IBAMA), são os órgãos federais responsáveis pela Avaliação e Registro de Agrotóxicos e Afins, e para esses produtos exige norma extremamente rigorosa que solicita vários ensaios. Enquanto que produtos biológicos a serem utilizados na saúde pública, embora sejam os mesmos, são regulados pela Lei nº 6.360, de 23 de setembro de 1976 (Brasil, 1976), possui normas menos rigorosas que não aborda questões ambientais. São avaliados e têm seu registro concedido somente pela ANVISA, que é um problema de ponto de vista da segurança ambiental (Oliveira-Filho, 2005).

No Brasil, os bioinseticidas são legalmente denominados de Agentes Microbiológicos de Controle (AMCs) (Oliveira-Filho, 2007), e definidos pela Instrução Normativa Conjunta nº 3, de 10 de março de 2006 (Brasil, 2006), como “os microrganismos vivos de ocorrência natural, bem como aqueles resultantes de técnicas que impliquem a introdução natural de material hereditário”, utilizados no controle de espécies nocivas. O registro de AMCs no Brasil é bem recente, os primeiros inseticidas à base de *B. thuringiensis* datam de 1991 (Oliveira-Filho, 2007).

As normas de avaliação ecotoxicológica são similares entre vários países. O Canadá segue os protocolos e os modelos da Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos (USEPA), e os países da União Européia têm normas próprias, mas pouco diferencia da USEPA (Oliveira-Filho, 2007). O modelo de avaliação em três fases orientado pela Organização Mundial de Saúde propõe: na fase I, a realização de testes de toxicidade básicos; na fase II, testes

complementares se houver evidências de efeitos na fase I; e na fase III, testes de mais alta complexidade, quando houver danos evidentes na fase II. A fase inicial apresenta os testes que são os mais executados (Meirelles & Santos, 2006).

Foram estabelecidos os critérios e exigências para o registro e a avaliação de um AMC. Dentre as exigências previstas na Instrução Normativa Conjunta publicada em 2006 pela ANVISA, o IBAMA e o MAPA encontram-se os testes de ecotoxicidade para a predição da periculosidade ambiental dos produtos. Esses testes consistem em determinar potenciais danos a organismos não-alvo do bioinseticida.

O uso de preparações à base de *B. thuringiensis sorovar israelensis* foi aprovado pela “U.S. Environmental Protection Agency” (EPA), em 1981, e o registro do uso comercial de *B. sphaericus*, nos Estados Unidos e na Europa foi obtido em 1990. Várias formulações de biolarvicidas são produzidas por diversas companhias e estão disponíveis comercialmente. As tabelas 1 e 2 apresentam alguns desses produtos, que vêm sendo utilizados para o controle biológico em muitos países tropicais (Rabinovitch *et al.*, 2000).

No Brasil, os inseticidas industrializados elaborados com essas bactérias não têm sido utilizados na plenitude das vantagens que oferecem para o controle de vetores de interesse em saúde pública. Enquanto os inseticidas convencionais vêm sendo utilizados em grande escala. E também, não existe uma política oficial estabelecida e praticada pelo governo federal que determine e estimule o emprego desses bioinseticidas no controle de vetores de doenças humanas (Rabinovitch *et al.*, 2000).

Tabela 1: Alguns produtos comercialmente disponíveis à base de *B. sphaericus*.

Fonte: Rabinovitch *et al.*, 2000.

Nome	Empresa/Origem	Tipo de formulação
Vectolex CG	Abbott Lab./EUA	grânulos
Biolar Spherix	Biotech Internaciona Limited/Índia	pó molhável
Griselesf 2362	Labiofam/Cuba	suspensão aquosa
Spherico SC	Geratec/Brasil	suspensão aquosa
Spherimos FC	Novo Nordisk/EUA	concentrado emulsionável

Tabela 2: Alguns produtos comercialmente disponíveis à base de *B. thuringiensis sorovar israelensis*. Fonte adaptada: Rabinovitch *et al.*, 2000.

Nome	Empresa/Origem	Tipo de formulação
Mosquito Dunks	Summit Chemical Co./EUA	tabletes
Bactimos Briquets	Summit Chemical Co./EUA	briquetes
Aquabac 200G	Becker Microbials/EUA	grânulos
Vertobac G e CG	Abbott Lab./EUA	grânulos
Bactimos WP	Novo Nordisk/Dinamarca	pó molhável
Tecknar	Zeneca/Brasil	pó molhável
Biocul Bactoculicide	Biotech Internaciona Limited/Índia	pó molhável
Vertobac AS	Abbott Lab./Brasil	suspensão aquosa
Bactivec	Labiofam/Cuba	suspensão aquosa

1.6. Efeitos dos *Bacillus* sobre organismo não-alvo

A bactéria *B. thuringiensis* foi um dos primeiros microrganismos utilizados como bioinseticidas, e diversas investigações sobre periculosidade ambiental foram realizados. Sobre *B. sphaericus* ainda existe poucos dados sobre o efeito em invertebrados e espécies aquáticas. A aplicação antrópica dos AMCs gera preocupação com a segurança ambiental, apesar de serem patógenos naturais de espécies-alvo. Questionamentos desse tipo têm motivado experimentos desde o desenvolvimento das AMCs, com o principal enfoque na observação de efeitos sobre insetos não-alvo, algumas aves e peixes. Maior temor ocorreu quando a proposta de uso de AMCs, em ambientes aquáticos, para combater larvas de insetos vetores de doenças (Oliveira-Filho, 2007).

A obtenção de dados sobre efeitos adversos em organismos aquáticos torna-se de grande relevância. Os testes de ecotoxicidade que visam predição da periculosidade ambiental dos produtos dos *B. thuringiensis* e *B. sphaericus*, são necessários para detectar danos potenciais a organismos não-alvo. E uma importante avaliação é a taxa de eliminação determinada após o término dos ensaios, para identificar a presença dos microrganismos no corpo da espécie exposta (Ramos *et al.*, 2007).

Neste contexto, o presente trabalho teve como objetivo avaliar a toxicidade aguda de dois produtos comerciais, sendo um à base de *B. thuringiensis* e outro de *B. sphaericus*, sobre peixes da espécie *Hyphessobrycon eques* (mato grosso) e determinar a quantidade de esporos remanescente no corpo

dos peixes após o término da exposição.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Local dos ensaios

Os ensaios foram realizados nas dependências do LABOCIEN no Centro Universitário de Brasília e no laboratório de Bacteriologia da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia (Brasília/DF), no período de setembro a outubro de 2008.

2.2. Descrição dos produtos à base de *B. thuringiensis* e *B. sphaericus*

Os produtos à base dos *B. thuringiensis* e *B. sphaericus* foram fornecidos pelo fabricante com as respectivas concentrações iniciais de $1,6 \times 10^8$ e 1×10^7 esporos/mL, mantidos na embalagem original e conservados em local fresco, seco e ventilado. A cepa utilizada do produto à base de *B. sphaericus* foi a S242 e do *B. thuringiensis* foi a S1806, ambas desenvolvidas pela Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia.

2.3. Caracterização do *H. eques* (mato grosso)

A espécie *Hyphessobrycon eques* Steindachner, 1882 (mato grosso), pertence à Ordem Characiformes e a família Characidae, representado na figura 1. Essa espécie conhecida como mato grosso vive sempre em grandes cardumes, é considerado carnívoro, que se alimenta de invertebrados, bentônicos ou zooplanctônicos. Toleram uma faixa de variação de temperatura entre 16 a 33 °C e pH entre 4,5 e 8,0, mostrando ser bem resistente a essas variáveis (Matheus, 2006).

O habitat desse peixe se estende desde a Amazônia até o sul do Brasil, Paraguai, Bolívia e Pantanal do Mato-Grosso. Encontram-se ainda nos rios Paraná e Paraguai. *H. eques* é bem utilizada na prática de aquarismo, podendo viver anos no aquário, mas são suscetíveis à toxicidade e extremamente vulneráveis ao cloro, podendo morrer em alguns minutos. Esse peixe aceita qualquer tipo de ração e é

facilmente adaptável ao aquário, de preferência com boa iluminação e plantas aquáticas naturais (Matheus, 2006).

Ainda de acordo com o mesmo autor, a preferência alimentar *H. eques* seria as larvas do mosquito *Aedes aegypti* (Diptera), por conter partes moles e facilmente digeríveis, com exceção da cápsula cefálica, que é quitinizada.

Essa espécie de peixe pode ser considerada com potencial para o controle biológico, por apresentar seleção positiva para as larvas de *A. aegypti*. E também é adaptada a viver em pequenos volumes de águas lânticas, podendo então, ser utilizada em época de epidemia de dengue para controle das larvas em pequenos açudes rurais, em caixa d'água, bebedouros de animais ou em recipientes com água (Matheus, 2006).



Figura 1: Peixe *H. eques*. Fotografia: Rosana Bernardes Silva.

Foram adquiridos comercialmente 54 peixes entre jovens e adultos, com comprimento entre 2,5 a 3,0 cm. Os peixes foram alimentados diariamente com a ração de marca Tetramin Tropical Flakes para peixe. E mantidos em água mole sintética padronizada pela ABNT e realizada às trocas da água duas vezes por semana.

2.4. Água mole sintética

Durante a realização dos ensaios foi utilizada a água mole sintética, que foi preparada de acordo com as normas da Associação de Normas Técnicas (ABNT, 2004), sendo necessário dispor de duas soluções. A primeira, de 1,5g de sulfato de cálcio ($\text{CaSO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) avolumado com água destilada para 1 L. Na segunda, 0,2g de cloreto de potássio (KCL), 4,8 de bicarbonato de sódio (NaHCO_3) e 6,1g de sulfato de magnésio ($\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) diluídos um a um em balão de 1000mL e avolumado com água destilada para 1L. As soluções ficaram armazenadas em geladeira dentro de frasco âmbar.

Para 10L de água foram necessários 200mL da solução 1 e 100mL da solução 2, avolumando o restante com água destilada. Antes da utilização nos ensaios a água foi oxigenada por 48 horas e depois o pH foi ajustado para $7,0 \pm 0,2$.

2.5. Determinação da toxicidade aguda dos produtos

Para realização dos experimentos seguiu-se a metodologia de Oliveira-Filho *et al.* (2007) e o protocolo experimental da Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos (USEPA), que recomenda a exposição dos organismos a uma concentração máxima do agente. Foram testadas as concentrações dos produtos contendo as bactérias na ordem de 10^6 , 10^5 , 10^4 , 10^3 e 10^2 esporos por mL de água de diluição. Os peixes foram expostos aos produtos à base de *B. thuringiensis* e *B. sphaericus* por meio do agente dissolvido na água. Na tabela 3 estão apresentadas as concentrações e a quantidade de peixes testados para cada produto.

Durante 30 dias 3 peixes jovens e adultos foram expostos em duplicata às concentrações específicas de cada produto do agente dissolvido e 3 peixes em duplicata para o controle negativo contendo água mole sintética, num volume de 1000 mL, em béqueres de 1000 mL. Às trocas de solução ocorreram duas vezes a cada semana.

Tabela 3: Concentrações de esporos/mL testadas para cada produto à base *B. thuringienses* (*Bt*) e *B. sphaericus* (*Bs*) nos peixes *H. eques*.

Produto	Nº de peixes	Concentração esporos/mL
<i>Bt</i>	6	10^6 , 10^5 e 10^4
<i>Bs</i>	6	10^6 , 10^5 , 10^4 , 10^3 e 10^2
Controle negativo	6	-

2.6. Ensaio de identificação da presença de microrganismos no corpo dos peixes

Conforme metodologia de Ramos *et al.* (2007), após 30 dias os organismos expostos foram colocados em água limpa, conforme tabela 4, onde permaneceram por 96 horas, sendo coletados periodicamente. Esse material foi encaminhado ao laboratório de Bacteriologia da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia (Brasília/DF) para a quantificação do número de esporos presentes em cada indivíduo.

Foram coletados aleatoriamente dois peixes expostos para cada concentração, esses organismos foram macerados em 2 mL de água destilada e depois aplicou-se um choque térmico em cada uma das soluções de peixe - *B. thuringiensis* e peixe- *B. sphaericus*. Em seguida, 100µL de cada uma dessas soluções foi riscado em placas com meio seletivo de penicilina (para o produto de *B. thuringiensis*) e estreptomicina (para o produto de *B. sphaericus*). As placas foram incubadas por aproximadamente 22h para posterior observação e contagem.

Tabela 4: Quantidade de indivíduos de cada concentração utilizados na quantificação da presença de esporos

Concentração	Número de peixes	Tempo após término de exposição		
		1h	48h	96h
Bs - 10^2	6	2	2	2
Bs - 10^3	6	2	2	2
Bt - 10^4	6	2	2	2
Bt - 10^5	1	1	0	0

2.7. Análise estatística

Os valores de Concentração Letal para 50% (CL50) dos peixes foram obtidos por meio do método Trimmed Spearman Karber (Hamilton *et al.*, 1977) disponível em programa para computador.

3. RESULTADOS

A exposição às concentrações de $1,6 \times 10^6$ e $1,0 \times 10^6$ esporos/mL dos produtos à base de *B. thuringiensis* e *B. sphaericus* respectivamente, resultaram em mortalidade dos peixes *H. eques* após duas horas de exposição. Nessas concentrações os peixes exibiram sinais de desconforto respiratório, agitação e nadaram na superfície da água.

As concentrações de $1,0 \times 10^5$ e $1,6 \times 10^5$ esporos/ mL resultaram em mortalidade de 83 a 100% dos peixes após de duas horas de exposição ao produto à base de *B. sphaericus* e após 14 dias para o produto à base de *B. thuringiensis*. A concentração $1,0 \times 10^4$ esporos/ mL do produto à base de *B. sphaericus* levou a 100% de mortalidade dos peixes em 24h de exposição apresentando sinais de estresse. Nessa mesma concentração o produto à base de *B. thuringiensis* não resultou mortalidade nos peixes e nem sinais de desconforto respiratório.

No decorrer dos 30 dias não houve mortalidade ou sinais de estresse nas concentrações inferiores para cada produto. Na tabela 5 é possível observar a mortalidade dos peixes em todas as concentrações testadas.

Tabela 5: Mortalidade de *H. eques* expostos aos produtos à base de *B. thuringiensis* (*Bt*) e *B. sphaericus* (*Bs*) após 30 dias de exposição.

Nº de peixes	Unidades de concentração		Mortalidade		
	esporos/mL	Diluição do produto (%)		Produto <i>Bt</i>	Produto <i>Bs</i>
		Produto <i>Bt</i>	Produto <i>Bs</i>		
6	10^2	-	0,001	-	0
6	10^3	-	0,01	-	0
6	10^4	0,01	0,1	0	6
6	10^5	0,1	1	5	6
6	10^6	1	10	6	6

Foi calculada a CL50 em 30 dias para o produto à base de *B. thuringiensis* apresentando o valor de 0,05% (0,02-0,09) ou $4,6 \times 10^4$ esporos/mL e 0,03% ou $3,1 \times 10^3$ esporos/mL para o produto à base de *B. sphaericus*. Os resultados mostram que para os produtos os valores em termos de percentuais de

diluição ficaram bastante próximos, enquanto houve diferença em termos de esporos por mililitro. A tabela 6 apresenta os valores calculados para as concentrações de esporos por mililitro e a porcentagem de diluição do produto.

Tabela 6: Valores de CL50 (30 dias) dos produtos à base *B. thuringiensis* (*Bt*) e *B. sphaericus* (*Bs*) para o peixe *H. eques*.

Concentração	CL50	
	<i>Bt</i>	<i>Bs</i>
Esporos/mL	4,6x10 ⁴ (2,3x10 ⁴ -9,3x10 ⁴)	3,1x10 ³
Diluição do produto (%)	0,05 (0,02 – 0,09)	0,03

Conforme tabela 7 pode-se observar que na primeira hora de exposição em água limpa foi encontrada quantidade maior que 6.580 esporos (UFC) na solução peixe-*B. thuringiensis*. Nesse tempo nenhum esporo foi encontrado na solução de peixe-*B. sphaericus*. Na amostragem após 48 horas, foi encontrada quantidade maior que 320 esporos (UFC) na solução peixe-*B. thuringiensis*, mantendo-se a ausência na solução peixe-*B. sphaericus*. Após 96 horas, observou-se que haviam restado apenas 03 esporos (UFC) na solução peixe-*B. thuringiensis* e mantendo-se ausência na solução peixe-*B. sphaericus*. Esses dados mostram que houve redução dos esporos no corpo dos peixes no decorrer 96 horas de exposição em água limpa para o produto à base de *B. thuringiensis* na concentração 1,6 x 10⁴ esporos/mL. E os peixes expostos ao produto à base de *B. sphaericus*, observou-se que haviam eliminado por completo as bactérias de seus corpos.

Tabela 7: Quantidade média de esporos no corpo dos organismos em função do tempo de exposição.

Concentração esporos/mL	Média de esporos em cada tempo		
	1h	48h	96h
<i>Bs</i> - 10 ²	0	0	0
<i>Bs</i> - 10 ³	0	0	0
<i>Bt</i> - 10 ⁴	> 6580	320	3
<i>Bt</i> - 10 ⁵	>10.000	-	-

4. DISCUSSÃO

A mortalidade observada durante a exposição às concentrações de 10^6 e 10^5 esporos/mL do produto à base de *B. thuringiensis* e às concentrações de 10^6 , 10^5 e 10^4 esporos/mL do produto à base *B. sphaericus*, também foi observada em outros estudos com o peixe *Pimephales promelas* (Snarski, 1990) e *Oncorhynchus mykiss* (Boeri, 1991). Nos trabalhos de Snarski (1990) e Boeri (1991) essa mortalidade foi atribuída à falta de oxigênio pelo excesso do produto na água.

Essa mesma falta de oxigênio foi observada no presente experimento a partir da visualização de desconforto e dificuldade dos peixes *H. eques* ao respirar, apresentando agitação e constante subida à superfície do béquer. Por outro lado os indivíduos do grupo controle não apresentaram tal desconforto ao respirar e permaneceram no fundo do béquer sem nenhuma agitação.

Snarski (1990) observou mortalidade dos peixes da espécie *P. promelas* em um estudo sobre a exposição à duas formulações comerciais a base de *B. thuringiensis*, Vectobac G e Mosquito Attack. Devido ao registro de alta depleção de oxigênio dissolvido na água nas concentrações $2,5 \times 10^6$ a $6,5 \times 10^6$ unidades formadoras de colônias UFC/ml de ambas as formulações. Segundo a autora, os peixes apresentaram estresse respiratório.

No presente estudo não foi observado efeito adverso nos peixes *H. eques* expostos por 30 dias à concentração 10^4 esporos/mL do produto à base de *B. thuringiensis* e às concentrações 10^3 e 10^2 esporos/mL do produto à base *B. sphaericus*. Segundo dados da Organização Mundial da Saúde (1999), não houve evidências de mortalidade, patogenicidade ou infectividade em um estudo com espécies de peixes expostos por 30 dias a concentração entre 10^9 e 10^{10} UFC/mL. Em outro estudo com *B. thuringiensis kurstaki*, foi observada a mortalidade de 20% de trutas expostas ao final de 32 dias, sendo atribuída à excessiva competição pelo alimento na água, muito turva pela presença das altas concentrações do microorganismo (Boeri, 1991).

Dados obtidos por Oliveira-Filho (Comunicação Pessoal) relatam uma CL50 em 30 dias de 0,05% (0,03-0,08) ou $4,6 \times 10^6$ esporos/mL do produto à base de *B. sphaericus* para o peixe da espécie *Danio rerio*. Tais resultados em comparação com os dados da tabela 6 mostram que para os produtos à base de *B.*

sphaericus e *B. thuringiensis* os valores em termos percentuais ficaram bastante próximos, enquanto houve diferença em termos de esporos por mililitro, o que leva a crer que é a formulação que está causando a toxicidade, e evidenciando que quanto mais concentrado em termos de esporos por mililitro for o inóculo inicial do produto menos tóxico ele será, pois a maior diluição para uso final reduzirá a possível toxicidade observada pela formulação do produto.

Oliveira-Filho *et. al.* (2007), demonstraram o efeito agudo de duas cepas de *B. thuringiensis* sem a formulação química – S1905 e S1806, e duas de *B. sphaericus* – S242 e S260 para o peixe *D. rerio*, nas concentrações de 1×10^6 e 5×10^6 unidades por mL. Após o término da exposição, foi observada ausência de mortalidade e de quaisquer sintomas de intoxicação, dado esse que evidencia que as cepas testadas não apresentaram efeito adverso agudo aos peixes expostos da espécie *D. rerio*. Duas das cepas utilizadas nesse ensaio foram às mesmas do presente estudo, o que deixa evidente que a mortalidade dos peixes *H. eques* não foi causada pelos *Bacillus*.

Os autores Gitahy *et al.* (2006) relatam que os *Bacillus* afetam espécies de insetos, sendo utilizados como agentes de controle biológico há mais de cinco décadas e afirma que as cepas não têm efeitos sobre o homem ou animais, excluindo os insetos alvo de controle.

Embora se tenha utilizado as concentrações máximas recomendadas pelo protocolo de ensaios da Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos (USEPA, 1996), observou-se que os valores que provocaram 100% de mortalidade dos peixes em ambas as formulações estavam acima do recomendado. Nos programas de saúde recomenda-se utilizar uma gota do produto para um litro de água, isso equivale as concentrações de 10^4 e 10^3 esporos/mL do produtos à base de *B. thuringiensis* e *B. sphaericus* respectivamente. E nessas concentrações o produto não causou efeitos adversos nos peixes do presente estudo.

Snarski (1990) também utilizou concentrações maiores que o recomendado, e sugeriu que os efeitos adversos observados nos peixes foi devido aos componentes das formulações e não ao cristal protéico da bactéria *B. thuringiensis*. A autora adverte sobre a necessidade de considerar os potenciais efeitos dos componentes das formulações durante as avaliações de riscos

ambientais para os produtos biológicos.

Segundo revisão de literatura realizado por Oliveira-Filho (2007), nos casos estudados em que foi registrado algum tipo de efeito adverso, os danos foram justificados pelo contato físico ou pela alta concentração do produto, o que pode gerar aumento da turgidez da água, supressão do oxigênio ou toxicidade dos componentes químicos presentes nas formulações.

Os resultados do ensaio da eliminação dos esporos de *B. thuringiensis* presentes no corpo dos peixes mostraram que no período de 96 horas, houve redução considerável do número de esporos de *B. thuringiensis* nos corpo dos peixes. Já os esporos *B. sphaericus* foram eliminados completamente desde a primeira hora de exposição em água limpa. Nos trabalhos de Snarski (1990) e Oliveira-Filho *et al.* (2007), a quantidade de esporos também caiu a cada período de exposição em água limpa e a eliminação por completo dos esporos ocorreu após 07 dias. Além disso, Snarski (1990) revelou que não houve a colonização das bactérias no intestino e a presença das bactérias foi indiferente para os peixes.

5. CONCLUSÃO

Os dados obtidos no presente trabalho permitem concluir que não houve mortalidade e outros sintomas de toxicidade aguda por influência das cepas do *B. thuringiensis* e *B. sphaericus* sobre peixes da espécie *H. eques*. Contudo, a formulação química dos produtos à base dessas bactérias evidenciou efeito adverso agudo à espécie de peixe testada. Esse dado evidencia a necessidade de mais estudos sobre a toxicidade aguda das formulações químicas dos produtos biológicos.

Houve redução significativa dos esporos de *B. thuringiensis* no corpo dos peixes e não houve acumulação de *B. sphaericus* no período de 96 horas após término da exposição.

Com o aumento da demanda pela utilização de práticas menos agressivas ao meio ambiente, por alimentos mais saudáveis e melhor qualidade de vida, torna-se fundamental a avaliação da toxicidade dos bioinseticidas, já que existe grande tendência para que o uso desses produtos seja ampliado em todo o mundo.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABNT (Associação Brasileira de Normas Técnicas). Ecotoxicologia aquática – Toxicidade aguda – Método de ensaio com peixes. NBR 15088. ABNT: Rio de Janeiro.2004.

AGUIAR-MENEZES, E. L. *Controle biológico de pragas: princípios e estratégias de aplicação em ecossistemas agrícolas*. 1ed., Rio de Janeiro: Editora Seropédica: Embrapa Agrobiologia, 44 p, 2003.

BERLITZ, D.L.; FIUZA, L.M. *Bacillus thuringiensis e Melia azedarach*. *Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento*, 8(35): 66-72,2005.

BOERI, R.L. Acute toxicity of ABG-6305 to the rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). 1991. Disponível em: <www.scribd.com/doc/1737008/Environmental-Protection-Agency-0247> . Acesso em 25 de nov. De 2008.

BRASIL. Lei nº 6.360, de 23 de setembro de 1976. Dispõe sobre a vigilância sanitária. Diário Oficial da União,24 de set, p.12647,1976.

BRASIL. Lei nº 7.802, de 11 de julho de 1989. Dispõe sobre agrotóxicos, seus componentes e afins. *Diário da União*, 12 de julho, p 11459-11460, 1989.

BRASIL. Instrução Normativa Conjunta nº 3, de 10 de março de 2006. Estabelece procedimentos para obtenção de registro de agentes microbiológicos de controle. *Diário Oficial da União*, 15 de março,p. 23-25, 2006.

CAPALBO, D.M.F.; VILAS-BÔAS, G.T.; ARANTES, O.M.N.; SUZUKI, M.T. *Bacillus thuringiensis*. *Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento*, 8(34): 78-85,2005.

FIUZA, M. L. Receptores de *Bacillus thuringiensis* em insetos. *Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento*, 7(32): 84-89,2004.

GERMANI, J.C.; LEAL, L.F.A.; NETO, A.L.R.; SILVEIRA, S.M.; MINGUELLI, R.M. Utilização de *Bacillus sphaericus* Neide,1904 para controle de *Culex quinquefasciatus*. *Caderno de Farmacia*, 3(2):47-57,1987.

GITAHY, P.M., GALVÃO, P.G.; BALDANI, J.I. Perspectivas Biotecnológicas de *Bacillus thuringiensis* no Controle Biológico da Broca da cana-de-açúcar *Diatraea saccharalis*. *Seropédica: Embrapa Agrobiologia*, 44p. 2006.

HAMILTON, M.A.; RUSSO, R.C.; THURSTON, R.V. Trimmed Spearman-Kärber method for estimating median lethal concentrations in toxicity bioassays. *Environmental Science and Technology*, 11(7): 714-719,1977.

MATHEUS, F.E. *Balanço energético e seletividade alimentar de Hypheosobrycon*

eques e Serrapinnus notomelas (Pisces, Characiformes). Tese (Mestrado). Universidade Federal de São Carlos, 2006.

MEIRELLES, L.C.; SANTOS, M.I.O. Regulamentação e Avaliação Tóxicológica de produtos de baixa toxicidade. In: Oliveira-Filho, E.C.; Monnerat, R.G. (eds.). *Fundamentos para regulação de semioquímicos, inimigos naturais e agentes microbiológicos de controle de pragas*. Planaltina, DF: Embrapa Cerrados, 2006. cap. 17, p.325-341.

MENEZES, J.P. Controle Biológico: na busca pela sustentabilidade da agricultura brasileira. 2001. Disponível em: <<http://www.agronline.com.br/artigos/artigo>>. Acesso em 20 de agosto de 2008.

MONNERAT, R.G.; PRAÇA, L.B. *Bacillus thuringiensis* e *Bacillus sphaericus* In: Oliveira-Filho, E.C.; Monnerat, R.G. (eds.). *Fundamentos para regulação de semioquímicos, inimigos naturais e agentes microbiológicos de controle de pragas*. Planaltina, DF: Embrapa Cerrados, 2006. cap. 06, p.121-155.

OLIVEIRA-FILHO, E. C. Segurança de Agentes Microbiológicos para o Controle de Pragas: Avaliação Toxicológica, Regulamentação e Situação Atual. *Revista Brasileira de Toxicologia*, (18)1: 71-75, 2005.

OLIVEIRA-FILHO, E. C. Avaliação da Periculosidade Ambiental de Bioinseticidas como uma Nova Perspectiva para a Ecotoxicologia no Brasil. *Journal of the Brazilian Society of Ecotoxicology*, 2(4): 1-7, 2007.

OLIVEIRA-FILHO, E. C.; MUNIZ, D. H. F.; RAMOS, F. R.; MONNERAT, R.G. Avaliação do Efeito Agudo de Inseticidas Bacterianos sobre Peixes da Espécie *Danio rerio*. In: X SIMPÓSIO DE CONTROLE BIOLÓGICO - SICONBIOL, 2007, Brasília. Anais do X Siconbiol. Brasília: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 2007. v. 1. p.203.

PETRY, F.; LOZOVEI, A.L.; FERRAZ, M. E.; NETO, L. G. S. Controle integrado de espécies de *Simulium* (Diptera, Simuliidae) por *Bacillus thuringiensis* e manejos mecânicos no riacho e nos vertedouros de tanques de piscicultura, Almirante Tamandaré, Paraná, Brasil. *Revista Brasileira de Entomologia*, 48(1): 127-132, 2004.

POLANCZYK, R. ; ALVES, S. *Bacillus thuringiensis*: uma breve revisão. *Revista Brasileira de Agrociência*, 7(2): 1-10, 2003.

PORTER, A.G. Mostoquicidal toxins, genes and bacteria: the hit squad. *Parasitology Today*, 12(5): 175-179, 1996.

PRAÇA, L. B.; BATISTA, A. C.; MARTINS, E. S.; SIQUEIRA, C. B.; SOUZA-DIAS, D. G.; MENDES-GOMES, A. C. M.; FALCÃO, R.; MONNERAT, R. G. Estirpes de *Bacillus thuringiensis* efetivas contra insetos das ordens Lepidoptera, Coleoptera e Diptera. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, 39(1):11-16, 2004.

RABINOVITCH, L.; BRAZÃO-SILVA, C.M.; ALVES, R.S.A. Controle biológico de vetores de doenças tropicais utilizando *Bacillus* entomopatogênicos. In: MELO, I.S.; AZEVEDO, J.L. (EDS.). *Controle Biológico* Jaquatiranga,SP: Editora Embrapa Meio Ambiente,2000. Cap.1, p 18-90.

RAMOS, F. R.; MUNIZ, D. H. F.; OLIVEIRA-FILHO, E. C.; MONNERAT, R.G. Eliminação de *Bacillus* em Peixes e Caramujos Após Exposição a Inseticidas Bacterianos. In: X SIMPÓSIO DE CONTROLE BIOLÓGICO - SICONBIOL, 2007, Brasília. Anais do X Siconbiol. Brasília : Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 2007. v. 1. p.204.

REGIS, L.; FURTADO, A.F.; OLIVEIRA, C.M.F.; BEZERRA, C.B.; SILVA,L.R.F.; ARAÚJO, J.; MACIEL, A.; SILVA-FILHA, M.A.; SILVA,S.B. Controle integrado do vetor da filariose com participação comunitária, em área urbana do Recife, Brasil. *Caderno Saúde Pública*, 12(4): 473-482, 1996.

SALLES, J.F.; BALDANI, J.I. *Bacillus thuringiensis* como agente de controle biológico. *Seropédica: Embrapa Agrobiologia*, 25p. 1998.

SAMWAYS, M.J. *Controle biológico de pragas e ervas daninhas*. 2ed., São Paulo: Editora Pedagógica e Universitária Ltda.,1989. cap. 01 , p. 1-16.

SILVA, S.F.; Dias, D.G.S.; MARTINS, E.S.; SOARES, C.M.C.S.; DIAS, J.M.C.S.; MONNERAT, R.G. *Prospecção de estirpes de Bacillus sphaericus tóxicas contra o Aedes aegypti e Culex quinquefasciatus*. 1 ed., Brasília:Editora Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 2002, 24p.

SNARSKI, V. M. Interactions between *Bacillus thuringiensis* subsp. *Israelensis* and fathead minnows, *Pimephales promelas* Rafinesque, under laboratory conditions. *Applied and Environmental Microbiolog*, 56(9) 2618- 2622,1990.

SOARES, C.M.S. Produção, formulação e aplicação de bactérias. In: Oliveira-Filho, E.C.; Monnerat, R.G. (eds.). *Fundamentos para regulação de semioquímicos, inimigos naturais e agentes microbiológicos de controle de pragas*. Planaltina,DF: Embrapa Cerrados, 2006. cap. 10, p. 219-235.

USEPA Environmental Protection Agency. *Microbial Pesticide Test Guidelines – Freshwater Fish Testing*. 1996. Disponível em: <http://www.epa.gov/opptsfrs/publications/OPPTS_Harmonized/885_Microbial_Pesticide_Test_Guidelines/Series/885-4200.pdf>. Acesso em 20 de agosto de 2008.

WHO (WORLD HEALTH ORGANIZATION). *Bacillus thuringiensis*. Environmental Health Criteria, 217. WHO, Geneve, 105 p,1999.